

【要約】

修士課程優秀論文

神経細胞死におけるリソソーム膜の破裂機構

Mechanism of lysosomal rupture in hippocampal CA1 neuronal death

金沢大学大学院医学系研究科再生脳外科学

佐 原 俊 矢

はじめに

海馬アンモン角CA1領域の神経細胞は学習と記憶および情動にかかわる重要な役割を担うが、一過性の虚血・再灌流傷害に対して脆弱性を示すことが知られている。虚血負荷によってCA1神経細胞の細胞質においては Ca^{2+} 動員が起こり、カルシウム依存性の蛋白分解酵素であるcalpainの活性化が誘導される。その後、活性型calpainはリソソーム膜に移動して特定の基質タンパク質を切断するため、リソソーム膜の安定性が崩れ、リソソームの破裂が起こる。その結果、リソソームに含まれるカテプシンなどの酵素が細胞質中に放出され、神経細胞死が惹起される。虚血性神経細胞死のカスケードとして従来ここまでは明らかにされていたが¹⁾、活性型calpainがCA1領域の神経細胞内において、具体的に何を基質として分解しているかはわかっていなかった。

一方、リソソームの破裂を引き起こす他の要因として、再灌流の間に起こるリソソーム膜の過酸化が考えられる。これは、リソソーム内の鉄がフェントン反応を通してミトコンドリア由来の H_2O_2 を HO^\cdot に転換し、 HO^\cdot が異常に増えた結果、生じる²⁾。強力なラジカルである HO^\cdot は、リソソーム膜のn-6系多価不飽和脂肪酸を酸化して、脂質過酸化物であるhydroxynonenal (HNE) を作る。このHNEは、リソソーム膜の安定化に関与するタンパク質をカルボニル化することにより、最終的にその機能障害を引き起こす。しかし、神経細胞においてHNEの標的となる基質タンパク質はこれまで特定されていなかった。

Heat shock protein 70.1 (Hsp70.1) は、ヒトのHsp70ファミリーの主要なタンパク質で、熱や虚血などの様々な傷害によって損傷を受け、変性したタンパク質の細胞内での蓄積を妨げ、それをリサイクルすることで様々なストレスから神経細胞を保護するシャペロン機能を持つことが知られている。また、腫瘍細胞においては、Hsp70.1はリソソーム膜に局在し、様々な刺激からリソソームを保護、安定化することが報告されている。このため、Hsp70.1による細胞保護の主なメカニズムは、シャペロン機能だけでなく、リソソーム膜の安定化であると考えられる。

興味深いことに、近年霊長類を用いた網膜のプロテオミクス解析により、生体内のcalpainの基質候補の一つとしてHsp70.1が同定された³⁾。また、これまでの研究から、一過性の脳虚血後、サル海馬CA1組織においてHsp70.1のカルボニル化レベルが著しく上昇していることがわかっている⁴⁾。このため、calpainによる生体内基質の切断と虚血後に生じるリソソーム膜の不安定化とは、虚血性神経細胞死において深い関連性があり、「活性型calpainの生体内基質と、HNEのカルボニル化の標的は、いずれもHsp70.1ではないか」という作業仮説を立て、以下の解析を行った。

結 果

リソソーム膜におけるHsp70.1、 μ -calpainとHNE付加物の相互作用

正常（非虚血）と虚血後1, 3, 5日目のサル海馬CA1組織

を用いて免疫組織化学により、虚血後のHsp70.1の神経細胞内での局在変化を観察した。まず、Hsp70.1とリソソーム膜タンパク質であるLamp-2に特異的な抗体を用いて2重染色を行った。その結果、非虚血の神経細胞ではHsp70.1の免疫反応性がほとんど見られなかったのに対し、虚血後のCA1領域の神経細胞においてHsp70.1の免疫反応性は増加していた。ことに、虚血後5日目には著しい免疫反応性の増加と、粗大顆粒状の発現が見られた。また、リソソーム膜は非虚血組織では小さいが、虚血後その形状は徐々に膨大していき、Hsp70.1は膨大したリソソーム膜に局在していた。すなわち、虚血後の神経細胞において、Hsp70.1はリソソーム膜に移動していることが示された。

次に、HNE付加物とLamp-2に特異的な抗体を用いて2重染色を行った。その結果、HNE付加物も非虚血組織と比べ、虚血後の神経細胞内で著しく増加し、それは膨大したリソソーム膜に局在していた。Hsp70.1とHNE付加物の2重染色を行うと、虚血後、両者は共に顆粒状の発現を示し、膨大したリソソーム膜での共存が見られた。これにより、リソソーム膜におけるHNEによるカルボニル化の標的はHsp70.1であることが示唆された。

また、活性型 μ -calpainとHsp70.1に特異的な抗体を用いて2重染色を行った結果、虚血後の神経細胞において、活性型 μ -calpainの発現は徐々に増加し、その発現はHsp70.1と膨大したリソソーム膜で共存していることが確認された。これより、虚血後のCA1神経細胞において、リソソーム膜に転移したカルボニル化されたHsp70.1は活性型 μ -calpainの基質である可能性が示唆された。

活性型 μ -calpainによるCA1組織のHsp70.1の切断

虚血負荷をかけていないサル海馬CA1組織のホモジナイズサンプルに、活性型 μ -calpainを加えた後、Hsp70.1のC末端と結合する特異的な抗体を用いてイムノブロット法を行いHsp70.1の切断の有無とその程度とを検索した（図1）。まず、 μ -calpainの至適活性条件を見つけるため、0.5 U μ -calpainに様々な濃度の Ca^{2+} を加えて μ -calpainを活性化させ、Hsp70.1の分解を追跡する実験を行った。その結果、低濃度の Ca^{2+} ではcalpainが活性化されずHsp70.1の切断は見られなかった（図1A, レーン1, 2）。しかし、これとは対照的に0.5, 1.0 mM Ca^{2+} 条件においてHsp70.1は切断され、 ~ 30 kDaのC末端側の断片を示した（図1A, レーン3, 4）。これにより、CA1組織に含まれるHsp70.1は μ -calpainの基質となり得ることが示された。

次に、Hsp70.1のカルボニル化が μ -calpainによる切断に

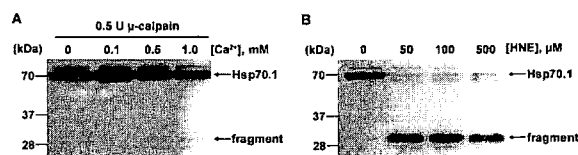


図1. 活性型 μ -calpainによる海馬CA1組織のHsp70.1の切断

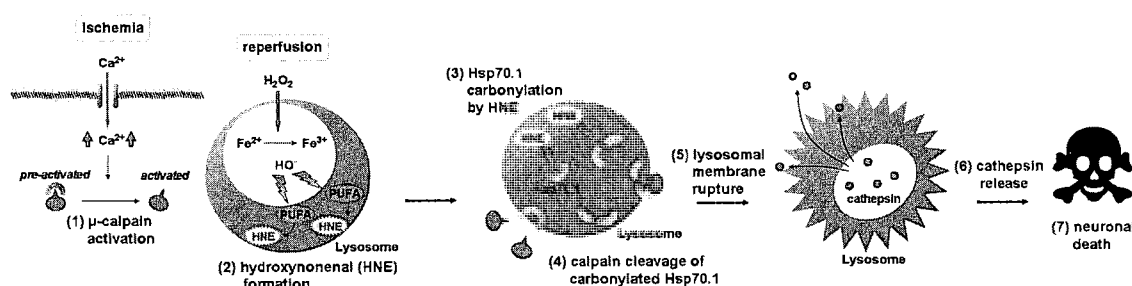


図2. カルパイン-カテプシン・カスケード

どのように影響を及ぼすのかを知るため、非虚血CA1組織のホモジナイズサンプルにHNEを加え、37℃で2時間インキュベーションした。すなわち、人為的に酸化ストレスを与えることでHsp70.1をカルボニル化させた後、活性型 μ -calpainを加え上記と同様の実験を行った。その結果、無処理のHsp70.1はわずかしこ分解されていないのに対し（図1B, レーン1）、HNEによってカルボニル化されたHsp70.1は、HNEの濃度に関係なく活性化 μ -calpain分解によって顕著に分解された（図1B, レーン2-4）。

次に、このHsp70.1の切断が μ -calpainによって特異的に引き起こされることを確認するため、上記と同様にHsp70.1をカルボニル化させた後、 μ -calpainに特異的な阻害剤であるALLNを加えて、活性型 μ -calpainによる切断が阻害されるか否かを見た。その結果、ALLNの濃度依存的にHsp70.1の切断は阻害された。以上より、Hsp70.1の切断は μ -calpainによって媒介されており、カルボニルHsp70.1が活性型 μ -calpainの生体内基質であることが証明された。

考 察

本研究では、Hsp70.1を含む正常（非虚血）および虚血・再灌流傷害後のサル海馬CA1組織を用いた免疫組織学的解析において、虚血後のCA1神経細胞で発現増加し、リソソーム膜に移動したHsp70.1が、活性型 μ -calpainの生体内基質となりうることを示唆された。さらに、イムノブロット解析では、活性型 μ -calpainは未処理のHsp70.1と比べ、HNEによって人為的な酸化ストレスを与えてカルボニル化したHsp70.1をよりドラスチックに切断して、 ~ 30 kDaのC末端側の断片産生が増加することを示した。これらのデータは、Hsp70.1は虚血・再灌流傷害を受けたCA1神経細胞においてcalpain依存性のリソソーム膜破裂のモジュレーターであることを示した。

海馬の神経細胞が、虚血・再灌流のような強力なストレスに曝されると、細胞のネクロシスを媒介するカルパイン-カテプシン・カスケードが誘導される。1998年に、虚血性神経細胞死のメカニズムとして、calpain依存性のリソソーム膜破裂によってリソソーム内のカテプシンが細胞質に漏出することによりCA1神経細胞のネクロシスが引き起こされるという、カルパイン-カテプシン仮説が提唱された¹⁾。その後この仮説は、線虫から霊長類に至るまで様々な種において検証されたが、リソソーム膜の破裂を引き起こすcalpainの正確な役割については不明確であった。このため、虚血後の神経細胞においてcalpainが基質とするタンパク質の同定は、カルパイン-カテプシン仮説の全容を解明するために不可欠であった。

脳は、神経細胞が膜電位を維持するために、多量の酸素を消費するという特徴がある。また、その機能を遂行するために細胞膜に多数のレセプターやチャネルを備えており、それらを維持するために多価不飽和脂肪酸が必須である。

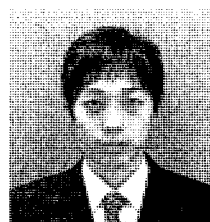
この2つの特性のため、脳は酸化ストレスに対し非常に脆弱性を示す。神経細胞の膜タンパクや膜リン脂質に生じる過酸化が、加齢による認知機能の低下やうつ病、脳卒中、パーキンソン病などの主因となっていることは良く知られている。つまり、活性酸素種によって引き起こされたリソソームの破裂が、様々な脳疾患の根本原因である神経細胞死に深く関与していると考えられる。このため、本研究における活性型 μ -calpainとカルボニル化Hsp70.1の空間的、分子的な相互作用の発見は、神経細胞死におけるカルパイン-カテプシン仮説の全容を明らかにしたのみならず、様々なヒトの脳疾患における神経保護治療の発展に寄与できるものと期待される。

結 語

本研究により、虚血性神経細胞死を引き起こすカルパイン-カテプシン・カスケードにおけるリソソーム膜の破裂機構が明らかになった（図2）⁵⁾。すなわち、虚血負荷がかかると、神経細胞内に Ca^{2+} の動員が起こり、カルシウム依存性の μ -calpainが活性化される（1）。一方、虚血後の再灌流によって生じた酸化ストレスによって過剰の H_2O_2 が生じ、リソソーム内でフェントン反応によって強力なラジカルである HO^\cdot に転換される。この HO^\cdot が、膜リン脂質の主要な構成成分であるn-6系の多価不飽和脂肪酸を攻撃することにより、反応性の高いHNEが生じ（2）、これがリソソーム膜に移動したHsp70.1をカルボニル化する（3）。このカルボニル化Hsp70.1は、活性型 μ -calpainによりきわめて効率的に切断され（4）、リソソーム膜の破裂が起こる（5）。その結果、リソソーム内のカテプシンなどの酵素が細胞質へ放出され（6）、最終的に、神経細胞死が起きる（7）。以上、虚血・再灌流傷害において、Hsp70.1はcalpain依存性のリソソーム膜破裂を誘導するキー・タンパク質であることが判明した。

参 考 文 献

- 1) Yamashita T. et al.: Prog. Neurobiol., 89, 343-358, 2009
- 2) Terman A. et al.: IUBMB Life, 58, 531-539, 2006
- 3) Nakajima E. et al.: Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 47, 5469-5475, 2006
- 4) Oikawa S. et al.: Free Radic. Biol. Med., 46, 1472-1477, 2009
- 5) Sahara S. and Yamashita T.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 393, 806-811, 2010



Profile

2008年3月	富山大学工学部物質生命システム工学科卒業
2010年3月	金沢大学大学院医学系研究科修士課程 修了
同年4月～	ピアス株式会社 勤務